

Patent

Attorney's Docket No. 017753-148

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of )  
Edoardo CAMENZIND et al. ) Group Art Unit: 1614  
Application No.: 09/897,476 ) Examiner: Unassigned  
Filed: July 3, 2001 )  
For: DEVICE FOR ADMINISTERING A )  
COMPOSITION IN A DUCT OF A )  
HUMAN OR ANIMAL BODY )  
)  
)

**CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign applications in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

France Patent Application No. 00 08751

Filed: July 4, 2000 and

France Patent Application No. 01 03286

Filed: March 9, 2001

In support of this claim, enclosed are certified copies of said prior foreign applications. Said prior foreign applications were referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copies is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

By:

Norman H. Stepmo  
Registration No. 22,716

Date: October 17, 2001

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

**08 AOUT 2000**

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*01

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Réservé à l'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire				
		DB 540 W /260899				
<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>4 JUIL 2000</b> LIEU <b>67 INPI STRASBOURG</b>		<b>1</b> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>TRANSGENE S.A.</b> <b>Département de Propriété Industrielle</b> <b>11 rue de Molsheim</b> <b>67082 STRASBOURG Cedex</b> <b>FRANCE</b>				
<small>N° D'ENREGISTREMENT</small> <small>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</small> <small>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE</small> <small>PAR L'INPI</small>		<b>0008751</b> <b>0 4 JUIL. 2000</b>				
<b>Vos références pour ce dossier</b> <small>( facultatif )</small> <b>TG 145 FRPR</b>						
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>N° attribué par l'INPI à la télécopie</b>						
<b>2. NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>				
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>				
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>				
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>				
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°		Date   / /		
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°		Date   / /		
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>				
<i>Demande de brevet initiale</i>		N°		Date   / /		
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)						
<b>Dispositif d'administration d'une composition dans un conduit du corps humain ou animal</b>						
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		<input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> Date   / /       N° <input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> Date   / /       N° <input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> Date   / /       N° <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>				
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>				
Nom ou dénomination sociale		TRANSGENE				
Prénoms						
Forme juridique		Société Anonyme				
N° SIREN		317 540 581				
Code APE-NAF						
Adresse	Rue					11 rue de Molsheim
	Code postal et ville					STRASBOURG
Pays		67000				
Nationalité		Française				
N° de téléphone ( facultatif )		03 88 27 91 83				
N° de télécopie ( facultatif )		03 88 27 91 41				
Adresse électronique ( facultatif )						

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

Réervé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES  
DATE **4 JUIL 2000**  
LIEU **67 INPI STRASBOURG**  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI **0008751**

DB 540 W /260899

<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>( facultatif )</i> <b>TG 145 FRPR</b>	
<b>6 MANDATAIRE</b>	
Nom _____	
Prénom _____	
Cabinet ou Société _____	
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____	
Adresse	Rue _____
	Code postal et ville _____
N° de téléphone <i>( facultatif )</i> _____	
N° de télécopie <i>( facultatif )</i> _____	
Adresse électronique <i>( facultatif )</i> _____	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>	
Les inventeurs sont les demandeurs	
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Établissement immédiat ou établissement différé	
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance	
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>	
<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention ( <i>joindre un avis de non-imposition</i> ) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt ( <i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i> )	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <i>(Nom et qualité du signataire)</i> <b>Michael Courtney</b> <b>04.07.2000</b>	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

## DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMpon DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
1 à 4; 1/3 à 3/3		5;	X	09/08/99	13 AOUT 1999 - S C H

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

L'invention concerne une méthode et un dispositif à mettre en œuvre dans le cadre de l'athérosclérose, en particulier pour lutter contre la resténose faisant suite à la pose d'un stent.

10 L'athérosclérose (Ross, 1999, Am. Heart. J. 138, 419-  
20) est une pathologie des artères caractérisée par l'envahissement de l'intima par plusieurs populations cellulaires (cellules musculaires lisses constituant la paroi du vaisseau et cellules inflammatoires) et une  
15 accumulation de substances collagéniques et de calcium conduisant à une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire et à une réduction de la lumière artérielle. Une des conséquences les plus graves de cette obstruction des vaisseaux, également appelée sténose, touche les artères  
20 coronaires dont le rôle est l'irrigation du cœur. Appelée insuffisance coronarienne, cette atteinte provoque une ischémie myocardique dont le syndrome associé le plus fréquent est l'infarctus (Roberts, 1998, Am. J. Cardiol.  
82, 41T-44T).

25 Deux modes de traitement des sténoses induites par l'athérosclérose sont actuellement proposés aux patients.

Le premier type de traitement, appelé pontage coronarien, se pratique lorsque les sténoses de l'artère sont importantes et multiples (Eagle et al., 1999, J. Am. Coll. Cardiol. 34, 1262-347). Il s'agit d'une approche chirurgicale qui vise à rétablir la circulation sanguine jusqu'au myocarde en contournant la coronaire obstruée. Pour cela, un segment vasculaire prélevé soit sur l'artère mammaire, soit sur la veine saphène est placé en amont et

5 débouche en aval de la partie sténosée. Ce traitement lourd nécessitant l'ouverture de la cage thoracique ne se pratique que dans un nombre de cas limité lorsque la seconde approche s'avère inapplicable.

La seconde approche, appelé angioplastie coronaire percutanée, consiste, dans un premier temps, à introduire dans la coronaire, au niveau de la zone obstruée, un cathéter muni à son extrémité d'un ballonnet. Dans un deuxième temps, le ballon est gonflé *in situ* afin d'écraser la plaque athéromateuse contre la paroi vasculaire et de rétablir un calibre coronarien suffisant pour permettre une perfusion myocardique satisfaisante (Cishek and Gershony, 1996, Am. Heart. J. 131, 1012-7). Cette seconde technique est la plus utilisée chez les patients souffrant d'insuffisance coronarienne. Elle représente 50 000 interventions par an en France et 500 000 par an aux Etats-Unis. Cependant, le traumatisme infligé à l'artère athéromateuse lors de la dilatation du ballon, entraîne dans 30% des cas, l'apparition d'une nouvelle lésion, appelée resténose, au site dilaté. Cette resténose caractérisée par une nouvelle réduction du calibre de l'artère est en fait liée à la survenue de deux phénomènes successifs. En premier lieu survient un remodelage artériel, qui correspond à une constriction du vaisseau en réponse au phénomène de dilatation et qui s'effectue de façon aiguë dans les heures qui suivent l'intervention (Pasterkamp et al., 2000, Cardiovasc. Res. 45, 843-52). En second lieu la resténose peut être provoquée par un processus de cicatrisation excessif se caractérisant par une prolifération des cellules musculaires lisses et une

5 synthèse abondante de matrice extracellulaire qui conduit à une réobstruction symptomatique de la coronaire traitée dans les mois qui suivent l'angioplastie (Schwartz et al., 1996, Int. J. Cardiol. 53, 71-80).

10 Le phénomène de remodelage peut être maîtrisé par la technique de "stenting" qui consiste en la mise en place après l'angioplastie d'une armature métallique maillée appelée stent. Le stent épouse la paroi du vaisseau et confère à l'artère une rigidité artificielle et mécanique qui empêche la phase de constriction aiguë et permet 15 d'obtenir un gain plus important de diamètre artériel. En quelques années cette procédure s'est généralisée et constitue désormais une technique standard de la cardiologie interventionnelle (Goy and Eeckhout, 1998, Lancet 351, 1943-9).

20 Cette technique permet une amélioration notable du pronostic à court terme des patients traités par angioplastie. Cependant, des épisodes de resténose surviennent encore chez 30 à 50% des sujets dans les six mois qui suivent la pose du stent.

25 Il est cependant important de noter que la réduction du calibre artériel au niveau du stent est exclusivement liée à une prolifération cellulaire et n'implique pas le phénomène de remodelage artériel. On parlera alors de resténose intra-stent qui est actuellement traitée par 30 redilatation de la zone obstruée à l'aide d'une nouvelle angioplastie. Malheureusement, ce traitement conduit de façon plus fréquente et plus rapide que la première intervention à une re-resténose de la lésion dilatée (Bossi et al., 2000, J. Am. Coll. Cardiol. 35, 1569-76).

5 L'incidence élevée du phénomène de resténose chez les patients traités par angioplastie et/ou pose de stent constitue un véritable problème de santé publique, responsable d'un coût estimé à 2 milliards de dollars par an aux Etats-Unis. A ce jour, aucun traitement  
10 pharmacologique efficace pour la prévention de la resténose n'est encore disponible. La brachythérapie reposant sur le positionnement d'un cathéter muni d'une source radioactive au niveau du rétrécissement artériel, permet d'éliminer l'hyperplasie cellulaire (Waksman et al., 2000, Circulation 101, 2165-71). Cependant, cette intervention, qui laisse la paroi non cicatrisée, entraîne des thromboses tardives et s'accompagne d'une prolifération cellulaire aux marges du segment vasculaire irradié (Waksman, 1999, Circulation 100, 780-2). A l'heure actuelle, elle ne constitue pas un  
15 traitement satisfaisant. Une autre approche en cours  
20 d'évaluation concerne la mise au point de traitements par thérapie génique.

De nombreuses données expérimentales concernant le transfert de gènes dans des cellules artérielles à l'aide de vecteurs adénoviraux, permet d'envisager une approche génique de la prévention et/ou du traitement de la resténose. Ainsi, le transfert de gènes codant pour des inhibiteurs de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle semble une voie thérapeutique prometteuse (Kibbe et al., 2000, Circ. Res. 86, 829-33 ; Macejak et al., 1999, J. Virol. 73, 7745-51 ; Claudio et al., 1999, Circ. Res. 85, 1032-9 ; Perlman et al., 1999, Gene Ther. 6, 758-63). Plusieurs problèmes restent cependant à résoudre avant que la

5 thérapie génique intravasculaire n'entre en pratique clinique et tout particulièrement les problèmes liés à l'efficacité du transfert de gènes dans les artères.

En effet, le transfert de gènes dans la paroi vasculaire normale ou athéromateuse demeure d'une 10 efficacité réduite. Les lames élastiques qui confèrent la plasticité aux artères constituent une barrière pour la pénétration en profondeur des vecteurs de transfert de gènes et la présence de plaques athéromateuses calcifiées chez l'individu malade diminue encore l'efficacité du 15 transfert de gènes (Maillard et al., 1998, Gene Ther. 5, 1023-30 ; Rekhter et al., 1998, Circ. Res. 82, 1243-1252). De même, le tissu resténotique constitué majoritairement de 20 cellules musculaires lisses et de cellules inflammatoires contient une abondante matrice extracellulaire qui forme une barrière à l'administration de vecteurs de transfert de gènes.

En outre, l'administration intra-coronarienne de vecteurs de transfert de gènes est rendue difficile par la fonction d'oxygénation du cœur qui est assurée par ces 25 artères. En effet, les expériences de thérapie génique réalisées sur des artères carotides ou fémorales de rat et de lapin utilisent un blocage de la circulation sanguine afin de mettre en contact la composition et la paroi vasculaire pendant une durée suffisante permettant une 30 efficacité d'administration maximale. Une telle approche n'est pas compatible avec la fonction des artères coronaires. Il est en effet impossible de bloquer durablement la circulation dans ces vaisseaux sans provoquer un accident cardiaque grave du à une oxygénation

5 insuffisante. Par conséquent, les temps de contact entre  
les cellules artérielles des coronaires et la composition  
doivent nécessairement être très court ce qui conduit  
souvent à une faible efficacité d'administration.

Dans ce contexte, un but de l'invention est de  
10 permettre d'injecter rapidement et le plus efficacement  
possible les vecteurs de transfert de gènes. Plus  
généralement, un but de l'invention est de fournir une  
méthode et un dispositif permettant d'administrer  
rapidement et efficacement une composition dans la paroi  
15 d'un conduit du corps humain ou animal, même dans  
l'hypothèse où un fluide circule dans ce conduit.

En vue de la réalisation de ce but, on prévoit selon  
l'invention une méthode pour administrer une composition  
dans une paroi d'un conduit d'un corps humain ou animal  
20 caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant  
à :

- entamer une face interne de la paroi du conduit  
pour réaliser des ouvertures borgnes dans une  
épaisseur de la paroi ; et
- mettre la composition en contact avec les  
ouvertures pratiquées dans la paroi.

La méthode pourra être réalisée à l'aide de deux  
dispositifs séparés (exemple 1) ou d'un seul dispositif  
combinant les deux propriétés (exemples 2 et 3).

30 Ainsi, grâce aux ouvertures entamant l'épaisseur de la  
paroi, la composition est mise en contact directement avec  
les cellules de la paroi. L'administration est donc  
efficace, même si la durée du contact est brève, par  
exemple si un fluide circule dans le conduit.

5        Dans le cas de l'administration au moyen de  
l'invention d'un vecteur de transfert de gènes pour lutter  
contre la re-resténose d'une artère, on a constaté  
expérimentalement que l'accessibilité des vecteurs aux  
cellules de la paroi était plus généralisée et s'étendait  
10      plus profondément suivant l'épaisseur de cette paroi,  
permettant ainsi d'envisager à terme une prévention plus  
efficace de la re-resténose.

La méthode selon l'invention pourra présenter en outre  
au moins l'une quelconque des caractéristiques suivantes :

- 15      - on entame la face interne en réalisant des  
incisions dans la paroi ;
- on réalise les incisions suivant une direction  
radiale par référence à une direction longitudinale  
du conduit ;
- 20      - préalablement à l'étape consistant à entamer la  
face interne, on dilate radialement la zone à  
entamer ;
- on met les ouvertures en contact avec la  
composition en faisant circuler la composition dans  
25      des canaux dont une face est formée par la face  
interne du conduit ;
- on met les ouvertures en contact avec la  
composition en faisant circuler la composition dans  
des canaux dont une face est formée par une paroi  
30      présentant des orifices externes ;
- le conduit est un vaisseau sanguin, par exemple,  
une artère ;
- le vaisseau présente une obstruction partielle ;
- le vaisseau porte un stent ;

- 5 - la composition est destinée à la mise en œuvre d'un traitement par thérapie génique;

On prévoit enfin selon l'invention une méthode pour administrer une composition dans une paroi d'un conduit d'un corps humain ou animal, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant à :

- 10 - introduire le dispositif de l'invention dans le conduit ;
- étendre radialement les organes de coupe ou de perforation pour entamer la face interne de la paroi en réalisant des ouvertures borgnes dans l'épaisseur de la paroi ;
- 15 - disposer les moyens de distribution ;
- étendre radialement les moyens de distribution ; et
- mettre la composition en contact avec les ouvertures.

20 On prévoit par ailleurs selon l'invention un dispositif pour administrer une composition dans une paroi d'un conduit d'un corps humain ou animal, le dispositif comprenant des moyens aptes à entamer une face interne de la paroi du conduit pour réaliser des ouvertures borgnes dans une épaisseur de la paroi et des moyens de distribution pour mettre la composition en contact avec les ouvertures.

25 Le dispositif pourra présenter de plus au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- 30 - les moyens aptes à entamer comprennent des organes de coupe ou de perforation ;
- les moyens pour entamer sont extensibles radialement par référence à une direction axiale du dispositif ;

- 5        - les moyens pour entamer sont associés à une chambre gonflable;
- les organes de coupe ou de perforation sont portés par une paroi de la chambre gonflable ;
- 10      - les moyens pour entamer sont associés à un tube sur lequel est monté une chambre gonflable ;
- les organes de coupe ou de perforation sont portés par le tube sur lequel est monté la chambre gonflable ;
- 15      - les moyens pour entamer comprennent des bras portant les organes de coupe ou de perforation ;
- les bras entourent la chambre gonflable;
- les moyens de distribution sont extensibles radialement par référence à une direction axiale du dispositif;
- 20      - les moyens de distribution présentent des canaux aptes à recevoir la composition, les canaux étant ouverts en direction opposée à un axe du dispositif ;
- les moyens de distribution comprennent une paroi présentant des orifices externes ;
- 25      - les moyens de distribution sont aptes à entourer les moyens pour entamer;
- les moyens de distribution sont aptes à coulisser par rapport aux moyens pour entamer suivant une direction axiale du dispositif;
- 30      - la chambre gonflable est apte à étendre radialement les moyens de distribution;
- le dispositif est destiné à administrer une composition dans la paroi d'un vaisseau sanguin tel qu'une artère, notamment une artère portant un stent;
- il s'agit d'un cathéter.

5        On prévoit en outre selon l'invention un dispositif pour administrer une composition dans une paroi d'un conduit d'un corps humain ou animal, le dispositif comprenant des moyens aptes à entamer une face interne de la paroi du conduit pour réaliser des ouvertures borgnes dans l'épaisseur de la paroi, ces moyens portant des organes de coupe ou de perforation et étant extensibles radialement par référence à un axe du dispositif, le dispositif comportant des moyens de distribution pour mettre la composition en contact avec les ouvertures, les moyens de distribution étant extensibles radialement et aptes à entourer les moyens pour entamer.

10      D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront encore dans la description suivante de trois modes préférés de réalisation de l'invention donnés à titre 15      20      d'exemples non limitatifs.

Exemple 1 :

Les figures 1 et 2 montrent deux cathétér商 commerciaux dont l'association permet de mettre en œuvre la méthode de l'invention.

25      Dans une première étape le cathéter « cutting balloon™ » (figure 1, Interventional Technologies, US 5,797,935) est avancé dans l'artère au site obstrué par la resténose intra-stent. La chambre gonflable est alors dilatée de façon à écraser la resténose et rétablir un 30      diamètre acceptable de l'artère. Le cathéter « cutting balloon™ » possède à la surface de la chambre gonflable trois ou quatre lames de rasoirs microchirurgicales. Ces lames sont conçues pour rendre la dilatation de l'artère moins traumatique en pratiquant des microfractures dans la

5 paroi et en diminuant les forces exercées sur l'artère. Lorsque la chambre gonflable est dilatée les lames de rasoirs se déploient radialement et créent des incisions dans le tissu resténotique.

Le cathéter « cutting balloon™ » est alors retiré et  
10 remplacé par le cathéter « Remedy balloon™ » (figure 2, Boston Scientific/SCIMED, US 5,792,105) qui est introduit au site dilaté de l'artère. La chambre gonflable de ce cathéter est dilatée et applique contre les ouvertures borgnes pratiquées dans la paroi de l'artère par le  
15 « cutting balloon™ » des canaux dont une face contient une paroi présentant des orifices externes. La composition est alors distribuer par les canaux et mise en contact avec les cellules de la paroi de l'artère par l'intermédiaire des orifices.

20 Les deux cathéters utilisés sont donnés à titre d'exemples non limitatifs. En particulier les cathéters « expandable and compressible atherectomy catheter » (US 5,556,408), « universal dilator with reciprocal incisor » (US 5,556,405), « Angioplasty balloon with light incisor » (US 5,624,433), «improved vascular incisor/dilator » (US 5,649,941), « universal dilator with expandable incisor » (US 5,697,944), « device and method for transecting a coronary artery » (US 5,713,913) pourront être utilisés en remplacement de « cutting balloon™ ». Les cathéters «  
25 infiltrator® » (Interventional Technologies), « Crescendo™ » (Cordis), « InfusaSleeve™ » (LocalMed), « Dispatch catheter™ » (Boston Scientific/SCIMED), « Hydrogel-coated balloon catheter™ » (Boston

5 Scientific/SCIMED) pourront être utilisés en remplacement  
de « Remedy balloon™ ».

Exemple 2 :

- les figures 3 à 10 montrent différentes étapes de mise en œuvre de la méthode selon l'invention au moyen d'un premier mode de réalisation du cathéter selon l'invention ;

10 Le cathéter 2 présente une extrémité distale destinée à être introduite dans le conduit à traiter. Cette extrémité comporte un outil interne 4 comprenant un ballon 15 6 de forme générale cylindrique allongée, arrondie à ses deux extrémités axiales. Le ballon 6 est monté sur un tube 8 le traversant de part en part suivant son axe. Une extrémité distale 10 du tube émerge de l'extrémité distale du ballon. De façon connue en soi pour les cathéters, le 20 tube 8 est creux et est en communication de fluide avec l'intérieur du ballon. De la sorte, le ballon peut être gonflé par amenée de liquide à travers le tube, à partir de l'extrémité proximale du cathéter, non-illustrée. Le 25 gonflement du ballon entraîne son extension radiale par référence à l'axe du cathéter .

Le ballon 6 porte sur sa paroi, en saillie de la face externe, des organes 16 aptes à entamer la face interne 12 d'une paroi d'un conduit du corps humain, tel qu'une artère 14. Les organes sont en l'espèce des organes de perforation 30 conformés en pointe, par exemple constitués par des cristaux.

L'extrémité distale du cathéter comporte de plus un outil externe 20. Cet outil est qualifié d'« externe » car il est destiné à s'étendre autour de l'outil interne 4.

5 Mais il est bien entendu destiné à s'étendre dans le conduit 14, tout comme l'autre outil. L'outil externe 20 comprend un manchon 22 ayant une paroi souple elle aussi de forme générale cylindrique allongée. Cette paroi 22 est creuse en son centre. Elle est ouverte à son extrémité 10 distale et a une extrémité proximale fermée de forme arrondie.

La paroi 22 présente, ménagés dans son épaisseur, des canaux allongés rectilignes 24 s'étendant parallèlement à l'axe du cathéter. Ces canaux ont un profil transversal 15 (dans un plan perpendiculaire à l'axe) en forme générale de « U », le fond du canal correspondant à la base du « U » s'étendant du côté de l'axe.

Comme on le voit notamment sur la figure 9, le manchon 22 est relié à un tube 26 par son extrémité proximale. Le 20 tube 8 de l'outil interne est reçu à coulisser dans le tube 26 de l'outil externe.

Le manchon souple est extensible radialement de sorte qu'il peut accroître son diamètre.

Chaque canal 24 est en communication de fluide avec 25 l'extrémité proximale du cathéter via une chambre de répartition 28 et via le tube 26 pour permettre l'aménée dans chaque canal d'une composition liquide à administrer à la paroi du vaisseau.

A l'extrémité proximale du cathéter de l'invention, 30 celui-ci comprend des moyens d'actionnement et de commande de l'extrémité distale, ainsi que des moyens d'injection de fluides. Cette extrémité proximale s'étend à l'extérieur du corps du patient et est manipulée par le personnel effectuant l'intervention chirurgicale.

5 Le cathéter qui vient d'être décrit est employé de la façon suivante pour mettre en œuvre la méthode selon l'invention.

On suppose que le conduit 14 à traiter est une artère coronaire humaine. Le tronçon à traiter présentait une plaque d'athérome qui a été traitée par expansion au moyen 10 d'un cathéter à ballon d'un type classique, puis par la pose d'une stent maillé 30 d'un type connu en soi et dont la trace dans le plan de coupe est visible sur les figures 3 à 10. A la suite de la pose du stent, une cicatrisation 15 excessive 32 du tronçon traité est intervenue, réduisant le diamètre interne de l'artère et réduisant la section disponible pour la circulation du sang. La méthode selon l'invention vise à limiter la reformation d'une cicatrisation excessive. Elle est destinée à traiter la 20 resténose en prévenant la re-resténose.

En référence à la figure 3, on achemine dans l'artère en regard du tronçon à traiter l'extrémité distale 2 du cathéter. L'outil interne 4 avec le ballon dégonflé, s'étend dans l'outil externe 20, coaxialement à celui-ci.

25 En référence à la figure 4, une fois l'extrémité distale placée en regard du tronçon, on fait coulisser vers l'arrière l'outil externe 20 pour dégager l'outil interne 4.

30 Comme l'illustre la figure 5, on gonfle ensuite le ballon 6 pour augmenter son diamètre de sorte que l'artère retrouve un diamètre interne acceptable et que les organes de perforation 16 pénètrent dans la face interne de l'artère. Ces organes réalisent des ouvertures borgnes radiales 36 dans l'épaisseur de la paroi de l'artère, à

5 partir de sa face interne. Ces ouvertures s'étendent donc au cœur de cette paroi. Les ouvertures 36 ont été illustrées sur la figure 6. Elles sont bien sûr plus petites et en plus grand nombre que ce qui a été illustré.

10 En référence à la figure 7, on dégonfle ensuite le ballon 6 pour réduire son diamètre.

On fait alors à nouveau coulisser axialement vers l'avant l'outil externe 20 pour qu'il entoure l'outil interne, comme le montre la figure 8.

15 Un fois l'outil externe en place, on gonfle à nouveau le ballon 6, ce qui provoque l'expansion du manchon d'administration 22 comme le montre la figure 9, les canaux venant se plaquer contre la face interne de l'artère qui ferme ainsi la face ouverte de chaque canal. On injecte alors dans le manchon 22 la composition à administrer.

20 Cette composition circule dans les canaux 24 et se diffuse dans toutes les ouvertures borgnes 36, ainsi que contre la face interne de l'artère. Cette étape de gonflage et d'administration dure un très court instant, sachant que la circulation du sang dans l'artère ne doit pas être

25 interrompue trop longtemps.

Immédiatement après, on dégonfle le ballon 6 afin de rétracter le manchon 22. On procède ensuite à l'extraction du cathéter comme illustré sur la figure 10.

30 On expliquera plus loin quels types de composition peuvent être administrées par cette méthode. On va de suite décrire un deuxième mode de réalisation du cathéter en référence aux figures 11 à 20.

Exemple 3 :

- 5 - les figures 11 et 12 montrent les bras et le ballon, respectivement à l'état dégonflé et gonflé, d'un cathéter selon un deuxième mode de réalisation de l'invention ;
- 10 - la figure 13 est une vue avec plus de détails des bras de la figure 11 ;
- La figure 14 est une vue en perspective d'un tronçon de bras du cathéter de la figure 13 ;
- La figure 15 est une vue en section transversale de l'ensemble des bras de la figure 13 ; et
- 15 - Les figures 16 à 20 illustrent des étapes de mise en œuvre de la méthode de l'invention au moyen du cathéter des figures 11 à 15.

Dans ce mode de réalisation, les références numériques des éléments analogues sont augmentées de 100.

20 L'outil interne 104 illustré à la figure 11 comprend encore un ballon 6 monté sur un tube 8 en vue de son gonflage. L'outil interne comporte de plus des bras 140, ici au nombre de trois, portant des organes coupants. Les bras sont reliés par leur extrémité proximale à un support cylindrique commun 142 fixé au tube. Chaque bras a une forme allongée en hélice autour de l'axe du cathéter, autour du ballon. Les trois bras sont uniformément répartis autour de l'axe. Les trois bras 140 sont réalisés en un matériau élastiquement flexible. Ils sont au repos lorsque 25 le ballon est dégonflé comme sur la figure 11. Lorsqu'on gonfle le ballon, comme sur la figure 12, les trois bras s'écartent élastiquement sous l'effet de la sollicitation du ballon. Ils conservent leur forme hélicoïdale mais le rayon de l'hélice se trouve augmenté. Chaque bras a

5 localement une forme plate, l'épaisseur du bras s'étendant suivant la direction radiale à l'axe. Chaque bras 7 porte sur sa face externe des organes coupants constitués ici par des arêtes vives 116 s'étendant en relief et en saillie de la face externe. Chaque arête 116 est rectiligne allongée  
10 et s'étend de l'un à l'autre des bords du bras. Les arêtes sont orientées ici parallèlement à l'axe du cathéter. Toutes les arêtes sont donc parallèles entre elles et s'étendent d'avant en arrière. La figure 15 montre la disposition des arêtes et des bras dans l'hypothèse où le  
15 cathéter comporte cinq bras.

En référence aux figures 16 à 20, l'outil externe 120 du cathéter comprend encore ici un manchon creux en son centre pour pouvoir y recevoir l'outil interne 104. La paroi souple est extensible radialement et creuse suivant son épaisseur. Les deux faces interne et externe de la paroi sont continues mais la face externe présente des orifices 124 pour l'administration de la composition.  
20

La méthode selon l'invention est mise en œuvre à l'aide de ce cathéter de la façon suivante.

25 On suppose que l'on se place dans le même contexte médical que dans le premier mode de réalisation.

L'outil interne 104 se trouvant initialement à l'intérieur de l'outil externe 120, on introduit l'extrémité distale du cathéter en regard du tronçon à traiter, comme illustré à la figure 16.  
30

En référence à la figure 17, on gonfle ensuite le ballon 6 pour étendre radialement l'ensemble du cathéter, notamment l'outil externe 120, ce qui augmente le diamètre interne de l'artère.

5 Le ballon demeurant à l'état gonflé, on fait coulisser l'outil externe 120 axialement vers l'arrière pour mettre les bras 140 directement en regard de l'artère, comme on le voit sur la figure 18.

10 On gonfle ensuite davantage le ballon pour augmenter encore son diamètre de sorte que les arêtes vives 116 entament la paroi de l'artère à partir de sa face interne et y réalisent des ouvertures borgnes 36, allongées suivant la direction longitudinale de l'artère, compte-tenu de l'orientation des arêtes vives. Les ouvertures prennent ici 15 la forme d'incisions illustrées grossièrement à la figure 20. L'orientation de ces incisions parallèlement à la direction longitudinale de l'artère facilite l'administration de la composition.

20 Ensuite, en référence à la figure 19, on dégonfle partiellement le ballon et on fait coulisser sur celui-ci l'outil externe axialement vers l'avant.

25 En référence également à la figure 19, on gonfle à nouveau le ballon et on injecte dans l'outil externe la composition à administrer. Cette composition remplit l'épaisseur de la paroi du manchon puis s'échappe à travers les orifices 124 pour entrer en contact avec la face interne de l'artère et les ouvertures borgnes. On dégonfle ensuite le ballon et on retire le cathéter, comme sur la 30 figure 20. Comme dans le premier mode, l'étape de l'administration de la composition a une durée très brève.

Le dispositif de l'invention permet l'administration *in vivo* de compositions, notamment pharmaceutiques. Selon un mode préféré, il s'agit de compositions destinées à la mise en œuvre de traitement de thérapie génique qui

5 renferment au moins un acide nucléique, généralement recombiné. Un acide nucléique est dit recombiné lorsqu' il renferme au moins une séquence codant pour un polypeptide d'intérêt (le gène) placée sous le contrôle de séquences permettant son expression dans des cellules cibles. D'une  
10 manière générale, l'acide nucléique qui renferme un tel gène est un vecteur qui permet le transfert dudit gène et son expression dans les cellules cibles.

Par « acide nucléique », on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin,  
15 linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans limitation de taille. Selon un mode de réalisation préféré, cet acide nucléique est choisi  
20 parmi le groupe consistant en un cADN ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager ; un ARN antisens; un ribozyme; un ARN de transfert; un ARN ribosomique; ou un ADN codant pour de tels ARN ; un polynucléotide libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules;  
25 un acide nucléique associé à au moins un polypeptide, notamment un polypeptide d'origine virale, et plus particulièrement d'origine adénovirale ou rétrovirale, préférablement un acide nucléique incorporé dans une particule virale infectieuse, ou un polypeptide  
30 synthétique; un acide nucléique associé à un ligand.

De façon préférée, selon la présente invention, « acide nucléique » désigne un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale. Le choix des plasmides

5 utilisables dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme du métier et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement, mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On peut citer à titre d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de réPLICATION assurant l'initiation de la réPLICATION dans une cellule productrice et/ou une cellule hôte (par exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoréPLICatif dans une cellule hôte mammifère, (Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées (par exemple complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence cer qui favorise le maintien sous forme de monomère d'un plasmide (Summers et Sherratt, 1984, Cell 36, 1097-1103), séquences d'intégration dans le génome cellulaire .

5        S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un poxvirus (par exemple virus de la vaccine, notamment MVA, canaripox), d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus (par exemple virus de la famille des Togavirus, notamment Semliki Forest virus), d'un foamy virus ou d'un virus associé à l'adénovirus. On aura de préférence recours à un vecteur non répliquatif et non intégratif. A cet égard, les vecteurs adénoviraux conviennent tout particulièrement à la mise en œuvre de la présente invention. Toutefois, il 10      convient de noter ici que dans le cadre de la mise en œuvre de la présente invention, la nature du vecteur revêt peu 15      d'importance.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et 20      à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application visant à agir sur le phénomène de la resténose. Un rétrovirus recombinant utilisable dans le cadre de l'invention comporte généralement les séquences LTR, une région d'encapsidation et la séquence 25      nucléotidique selon l'invention placée sous le contrôle du LTR rétroviral ou d'un promoteur interne tels que ceux décrits ci-après. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain, etc.) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), 30      MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir en trans les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature

5 (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTR (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région  
10 d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises FR 94 08300 et FR 97 05203).

On pourra également avoir recours à un vecteur adénoviral défectif pour la réPLICATION, c'est à dire dépourvu de tout ou partie d'au moins une région  
15 essentielle à la réPLICATION sélectionnée parmi les régions E1, E2, E4 et/ou L1-L5. Une délétion de la région E1 est préférée. Mais elle peut être combinée à d'autres modification(s) / délétion(s) touchant notamment tout ou partie des régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où  
20 les fonctions essentielles défectives sont complémentées en trans au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire afin d'assurer la production des particules virales d'intérêt. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de l'art antérieur tels que par exemple ceux décrits dans les demandes internationales  
25 WO 94/28152 et WO 97/04119. A titre illustratif, la délétion de la majorité de la région E1 et de l'unité de transcription E4 est tout particulièrement avantageuse. Dans le but d'augmenter les capacités de clonage, le vecteur adénoviral peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon une autre alternative, on peut mettre en œuvre un vecteur adénoviral minimal retenant seulement les séquences essentielles à l'encapsidation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal  
30

5 Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation. Par  
ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral selon  
l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de  
l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un  
adénovirus d'origine humaine ou animale (par exemple  
10 canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine, simienne)  
ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome  
adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut  
citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2  
d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de  
15 type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol.,  
1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol.,  
1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28  
; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102).  
Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine  
20 humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype  
C, notamment de type 2 ou 5. Un vecteur adénoviral selon la  
présente invention peut être généré in vitro dans  
Escherichia coli (E. coli) par ligation ou recombinaison  
homologue (voir par exemple WO 96/17070) ou encore par  
25 recombinaison dans une lignée de complémentation. Les  
différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques  
de préparation sont connus (voir par exemple Graham et  
Prevect, 1991, in Methods in Molecular Biology, vol 7, p  
109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc).

30 S'agissant d'un vecteur non viral, il concernera plus  
spécifiquement le cas selon lequel un vecteur plasmidique  
tel que présenté ci-dessus est associé à un composé ou une  
combinaison de plusieurs composés permettant de faciliter  
son transfert à l'intérieur des cellules. De tels composés

5 permettent en particulier d'améliorer l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité d'un vecteur, particulièrement d'un vecteur d'origine plasmidique, et/ou la protection dudit vecteur *in vivo* à l'égard du système immunitaire de l'organisme hôte (Rolland A, Critical  
10 reviews in Therapeutic Drug Carrier System, 15, (1998), 143-198). Ces substances s'associent aux acides nucléiques par interaction électrostatique, hydrophobe, cationique, covalente ou préférentiellement non covalente. De telles substances sont largement documentées dans la littérature  
15 accessible à l'homme du métier (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif, mais non limitatif, il peut  
20 s'agir de polymères cationiques, de lipides cationiques, mais également de liposomes, de protéines nucléaires ou virales ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Des exemples de tels composés, ainsi que de méthodes permettant  
25 de mesurer leur capacité à améliorer l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité d'un vecteur donné, sont notamment disponibles dans les demandes de brevet WO 98/08489, WO 98/17693, WO 98/34910, WO 98/37916, WO 98/53853, EP 890362 ou WO 99/05183. Il peut notamment  
30 s'agir de substances lipidiques telles que le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS, 84, 7413-7417), le DOGS ou Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS, 86, 6982-6986), de la DMRIE ou DORIE (Felgner et al., 1993, Methods, 5, 67-75), du DC-CHOL (Gao et Huang, 1991, BBRC, 179, 280-285),

5 du DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene Therapy, 2, 674-  
622) ou de la Lipofectamine™. Il peut également s'agir d'  
un polymère cationique tel que par exemple la  
polyamidoamine (Haensler et Szoka, Bioconjugate Chem. 4  
(1993), 372-379), un polymère "dendrimer" (WO 95/24221), du  
10 polyéthylène imine ou du polypropylène imine (WO 96/02655),  
du chitosan, un poly(aminoacide) comme la polylysine (US-  
5,595,897 or FR- 2 719 316) ; un composé polyquaternaire ;  
la protamine; les polyimines; le polyéthylène imine ou le  
polypropylène imine (WO 96/02655); les polyvinylamines; les  
15 polymères polycationiques substitués par le DEAE, comme les  
pullulanes, les celluloses; la polyvinylpyridine; les  
polymethacrylates; les polyacrylates; les polyoxéthanes; le  
polythiodiethylaminomethylethylene (P(TDAE)); la  
polyhistidine; la polyornithine; le poly-p-aminostyrène;  
20 les polyoxéthanes; les co-polymethacrylates (par exemple  
les copolymères d'HPMA; N-(2-hydroxypropyl)-  
methacrylamide); les composés décrits dans US-A-3,910,862,  
les complexes de polyvinylpyrrolide de la DEAE avec le  
méthacrylate, le dextran, l'acrylamide, les polyimines,  
25 l'albumine, le 1-dimethylaminomethylmethacrylate et le  
chlorure d'ammonium de polyvinylpyrrolidone-  
methylacrylaminopropyltrimethyl; les polyamidoamines; les  
composés télomériques (demande de brevet EP 98401471.2).  
Néanmoins, cette liste n'est pas exhaustive et d'autres  
30 polymères cationiques connus peuvent être utilisés pour  
obtenir les complexes d'acides nucléiques de l'invention.  
De plus ces lipides et polymères cationiques peuvent être  
fluorinés (voir par exemple WO 98/34910). Dans un cas  
avantageux, de tels vecteurs non-viraux renferment en outre

5 un adjuvant tel que par exemple un lipide neutre, zwitterionique ou chargé négativement. Ces lipides neutres, zwitterioniques ou chargés négativement peuvent être, par exemple, sélectionnés dans le groupe comprenant les phospholipides naturels d'origine animale ou végétale, tels  
10 que la phosphatidylcholine, la phosphocholine, la phosphatidyléthanolamine, la sphingomyéline, la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol, la céramide ou la cérebroside et leurs analogues ; les phospholipides synthétiques qui comportent généralement, mais non  
15 exclusivement deux chaînes d'acide gras identiques, tels que la dimyristoylphosphatidylcholine, la dioleoylphosphatidylcholine, la dipalmitoylphosphatidylcholine, la distearoylphosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine  
20 (PE) et le phosphatidylglycérol, et leurs analogues ; la phosphatidylcholine, la cardiolipine, la phosphatidyléthanolamine, mono-, di- ou triacylglycérol, et l'alpha-tocophérol et leurs analogues ; le phosphatidylglycérol, l'acide phosphatidique ou l'analogue  
25 d'un phospholipide similaire ; le cholestérol, les glycolipides, les acides gras, les sphingolipides, les prostaglandines, les gangliosides, les niosomes, ou tout autre amphiphile naturel ou synthétique.

30 Par «acide nucléique renfermant une séquence codant pour un polypeptide d'intérêt», on entend indiquer que ledit acide nucléique comprend un gène codant pour un polypeptide d'intérêt, et des éléments d'expression d'undit

5 gène. Le terme « polypeptide » s'entend sans restriction quant à sa taille ou son degré de glycosylation.

Dans le cas où l'acide nucléique comprend une séquence codant pour un polypeptide d'intérêt, il convient de préciser que ledit acide nucléique comporte en outre les 10 éléments nécessaires afin d'assurer l'expression de ladite séquence après transfert dans une cellule cible, notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les 15 séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Les éléments nécessaires à l'expression sont constitués par l'ensemble des éléments permettant la transcription de la séquence nucléotidique en ARN et la 20 traduction de l'ARNm en polypeptide, notamment les séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les 25 séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Ces éléments peuvent être régulables ou constitutifs. Bien entendu, le promoteur est adapté au vecteur retenu et à la cellule hôte. On peut citer, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol., 7, 838-848), α-1 30 antitrypsine, CFTR, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour les immunoglobulines, pour la β-actine (Tabin et al., 1982, Mol. Cell Biol., 2, 426-436), SRα (Takebe et al., 1988,

5 Mol. Cell. Biol., 8, 466-472), le promoteur précoce du  
virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma  
Virus), le promoteur de MPSV, le promoteur TK-HSV-1, le  
promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus), les  
promoteurs du virus de la vaccine p7.5K pH5R, pK1L, p28,  
10 p11 et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP ou une  
combinaison desdits promoteurs. Le promoteur précoce du  
Cytomégalovirus (CMV) est tout particulièrement préféré.  
Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant  
l'expression du gène spécifiquement dans une cellule  
15 musculaire lisse. On peut citer notamment les promoteurs  
des gènes de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (Foster et al.,  
1992, J. Biol. Chem. 267, 11995-12003 ; Shimizu et al.,  
1995, J. Biol. Chem. 270, 7631-7643), de la chaîne lourde  
de myosine de muscle lisse (Katch et al., 1994, J. Biol.  
20 Chem. 269, 30538-30545) de la desmine (EPO 999 278 ;  
Mericskay et al., 1999, Current Topics in Pathology Vol 93  
p7-17 Eds Desmoulière et Tuchweber, Springer-Verlag Berlin  
Heidelberg) et du SM22 $\alpha$  (Kim et al., 1997, J. Clin. Invest.  
100, 1006-14). S'agissant de promoteurs spécifiques on peut  
25 plus particulièrement envisager des promoteurs chimériques  
permettant une expression dans les cellules musculaires  
lisses à la fois forte et spécifique. Il est également  
possible d'utiliser une région promotrice tissu-spécifique  
et/ou activable dans des conditions définies. La  
30 littérature procure un grand nombre d'informations  
relatives à de telles séquences promotrices. Par ailleurs,  
ledit acide nucléique peut renfermer au moins deux  
séquences, identiques ou différentes, présentant une  
activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux

5 séquences codant pour un polypeptide d'intérêt, identiques ou différentes, situées l'une par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou en sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdites séquences ne soit pas affectée. Dans le cas où l'acide nucléique renferme au moins deux séquences codant pour un polypeptide, il convient de noter que l'une d'entre elles au moins doit coder pour un polypeptide d'intérêt tel que défini selon la présente invention (i.e. ayant au moins une activité anti-proliférative), les autres séquences quant à elles peuvent également coder pour un tel polypeptide, ou pour tout autre polypeptide que l'homme du métier jugera utile d'exprimer dans le cadre des techniques de l'invention (par exemple un polypeptide ayant une activité anti-migratoire). De même, dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (WO 94/29471). Ledit acide nucléique pourra également renfermer des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réPLICATION et/ou pour l'intégration, pour la sécrétion, pour la transcription ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme du métier. Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à

5 l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection. Dans le cadre de la présente invention, il est possible d'utiliser l'intégralité ou une partie seulement de la séquence d'acide nucléique codant pour le 10 polypeptide d'intérêt, ou un polypeptide dérivé ou muté, dans la mesure où la fonction et les propriétés anti-prolifératives ou antimigratoires de ce polypeptide sont conservées. Au sens de la présente invention, on entend par mutation, une délétion et / ou une substitution et / ou une 15 addition d'un ou plusieurs nucléotides. De même, il est envisageable d'utiliser une séquence codant pour un polypeptide hybride provenant de la fusion de la séquence codant pour un polypeptide d'intérêt selon l'invention et de la séquence codant pour un polypeptide d'un autre type 20 (par exemple, cytotoxique, d'ancre membranaire, de sécrétion).

« séquence codant pour un polypeptide d'intérêt ou gène » : concernant l'application cardiovasculaire (resténose) les gènes intéressants seront ceux codant pour des inhibiteurs de la migration et de la prolifération des 25 cellules musculaires lisses de la paroi artérielle , ceux présentant une activité vasoprotectrice, cytostatique, proapoptotique, cytotoxique. Des exemples sont proposés ci-dessous ou dans les documents suivants dont les contenus 30 font partie intégrante de la demande par référence : Kibbe et al., 2000, Circ. Res. 86, 829-33 ; Macejak et al., 1999, J. Virol. 73, 7745-51 ; Claudio et al., 1999, Circ. Res. 85, 1032-9 ; Perlman et al., 1999, Gene Ther. 6, 758-63.

Des exemples de polypeptides codés par le gène 35 d'intérêt, pouvant être utilisés dans la cassette

5 d'expression de la présente invention, incluent, sans limitation :

- des polypeptides impliqués dans le cycle cellulaire tel que p21, p16, le produit d'expression du gène du rétinoblastome (Ab), des inhibiteurs de kinase, de préférence du type dépendant de cycline GAX, GAS-1, GAS-3, GAS-6, GADD-45, GADD-153 et cycline A, B et D, des inhibiteurs de c-myc, c-myb, Cdk et H-ras
- des polypeptides impliqués dans l'apoptose, comme p53, Bas, Bcl2, Bcl1X, Bad ou d'autres antagonistes,
- des polypeptides angiogéniques, tels que les membres de la famille des facteurs de croissance endothéliaux (VEGF), des facteurs de croissance transformant (TGF et particulièrement TGF $\alpha$  et  $\beta$ ), des facteurs de croissance épithéliaux (EGF), des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF, et particulièrement FGF $\alpha$  et FGF $\beta$ ), des facteurs de nécroses des tumeurs (TNF et particulièrement TNF $\alpha$  et TNF $\beta$ ), des protéines de la famille CCN (qui inclut CTGF, Cyr61, Nov, Elm-1, Cop-1 et Wisp-3), les facteurs de dispersion/facteurs de croissance d'hépatocyte (SH/HGF), l'angiogénine, l'angiopoïétine (en particulier 1 et 2), l'angiotensine-2, cytokines (qui incluent en particuliers les interférons  $\beta$  et  $\gamma$ ),
- des polypeptides capables de diminuer ou d'inhiber une prolifération cellulaire, qui incluent des anticorps, des toxines, des immunotoxines, des polypeptides inhibants, les produits d'expression d'oncogène (ras, MAP kinase, les récepteurs tyrosine kinase, les facteurs de croissance), le

- 5                   ligand de fas, des produits de gène suicide (par exemple, HSV-tk, cytosine désaminase),
- 10                 - des polypeptides capables de diminuer ou d'inhiber une migration cellulaire,
- 15                 - des polypeptides capables de moduler ou de réguler l'expression de gènes cellulaires,
- 20                 - des facteurs de coagulation (Facteur VIII, Facteur IX,...),
- 25                 - des enzymes tels que l'uréase, la rénine, la thrombine, les métalloprotéinases, les synthases de monoxides d'azote (eNOS ou iNOS), SOD, Catalase, oxygénase d'hème, la famille des lipases lipoprotéines,
- 30                 - les peptides natriurétiques A, B et C
- des récupérateurs de radicaux oxydés,
- des inhibiteurs d'enzymes, tels que l'alphaI-antitrypsine, l'antithrombine III, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (TIMP 1-4) ,
- des facteurs de transcription, tels que les récepteurs nucléaires qui comprennent un domaine de liaison de l'ADN, un domaine de liaison d'un ligand, et un domaine d'activation ou d'inhibition de la transcription (par exemple, des produits fusions dérivés des récepteurs à l'œstrogène, aux stéroïdes ou à la progestérone,
- des marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, CAT, luciférase, GFP...)

5 - et tout polypeptide qui est reconnu dans l'art  
comme étant utile pour le traitement ou la  
prévention d'une condition clinique.

Le polypeptide d'intérêt qui est codé par la séquence comprise dans ledit acide nucléique est choisi de préférence parmi les polypeptides présentant une activité antiproliférative ou anti-migratoire, les facteurs protéiques vaso-protecteurs, les facteurs protéiques angiogéniques et les polypeptides présentant une activité d'activation de l'apoptose cellulaire, les cytokines, les protéines codées par un gène appelé « gène suicide ». Les cytokines sont des molécules naturellement produites à la suite d'une stimulation antigénique ou d'une réaction inflammatoire (Gillis and Williams, 1998, Curr. Opin. Immunol., 10, 501-503) dont l'utilité dans le cadre du traitement de la resténose a été montrée notamment par Stéphan D (Mol Med, 1997, 3, 593-9). Selon cette première variante de l'invention, le polypeptide d'intérêt désignera préférentiellement les interférons  $\beta$  et  $\gamma$  qui ont été démontrés comme capables d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro* et *in vivo* ( Stéphan D ; Stopeck A, Cell transplantation, 1997, 6, 1-8).

Selon une autre variante de l'invention, le polypeptide d'intérêt est un polypeptide présentant une activité anti-migratoire. Selon cette variante de l'invention, le polypeptide d'intérêt désignera préférentiellement un inhibiteur de metalloprotéinases (TIMP1-4) capable d'inhiber la digestion de la matrice

5 extracellulaire et donc de diminuer la migration des  
cellules musculaires lisses de la média vers l'intima  
(Cheng L, 1998, Circulation, 98, 2195-2201).

Selon une autre variante de l'invention, le  
10 polypeptide d'intérêt est un polypeptide présentant une  
activité vaso-protectrice. Selon cette variante de  
l'invention, le polypeptide d'intérêt est  
préférentiellement un vasorelaxant capable de réguler la  
prolifération des cellules musculaires lisses et d'exercer  
15 une action vaso-protectrice en induisant une accumulation  
de cGMP (Hikaru U, 1997, Circulation, 96, 2272-2279).

Selon une autre variante de l'invention, le  
polypeptide d'intérêt est un polypeptide présentant une  
20 activité angiogénique. Les rôles potentiels du facteur  
plaquétaire (PDGF), de la thrombospondine, des facteurs  
fibroblastiques (FGFs), des facteurs de croissance  
transformant (TGF et particulièrement TGF $\alpha$  et  $\beta$ ) et des  
facteurs de croissance épithéliaux (EGF) sur la prévention  
25 de la resténose ont été discutés (Cerek, 1991, Am. J.  
Cardiol., 68, 24-33) et le rôle du facteur de croissance  
endothélial (VEGF) a plus particulièrement été mis en  
évidence *in vivo* par son action sur la réendothélialisation  
de l'artère lésée (Asahara, Circulation, 1994, 3291-3302)

30

Selon une autre variante de l'invention, le  
polypeptide d'intérêt est un polypeptide codé par un gène

5 appelé « gène suicide ». De nombreux couples gène suicide/prodrogue sont actuellement disponibles. On peut citer plus particulièrement, les couples (a) thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 (TK HSV-1) et acyclovir ou ganciclovir (GCV) et (b) cytosine désaminase 10 (CDase) et 5-fluorocytosine (5FC) ayant démontré une capacité à inhiber la prolifération néointimale en modèle animal (Takeshi O, 1994, Science, 781-784 ; Harrell R, 1997, Circulation, 96, 621-627 et les couples purine 15 nucleoside phosphorylase d'Escherichia coli (E. Coli) et 6-methylpurine deoxyribonucleoside (Sorscher et al., 1994, Gene Therapy 1, 233-238) ; guanine phosphoribosyl transférase d'E. coli et 6-thioxanthine (Mzoz et Moolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595) et

Selon un cas avantageux , l'invention concerne le cas 20 selon lequel ledit polypeptide d'intérêt présente au moins une activité enzymatique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucléoside phosphorylase, l'activité guanine ou uracile ou orotate phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine 25 désaminase.

Enfin, le polypeptide d'intérêt peut être un polypeptide présentant une activité d'activation de l'apoptose cellulaire, et plus particulièrement le ligand de Fas qui est capable d'inhiber la formation de néointima 30 (Luo Z, 1999, Circulation, 99, 1776-1779).

Les séquences codant pour les polypeptides d'intérêt de l'invention peuvent être aisément obtenues par clonage,

5 par PCR ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles en usage. Il peut s'agir de gènes natifs ou dérivés de ces derniers par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides. Par ailleurs, leurs séquences sont largement décrites dans  
10 la littérature consultable par l'homme du métier.

Les compositions qui pourront être administrées à l'aide du dispositif de l'invention peuvent être formulées avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement  
15 isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, un tel support peut renfermer tout solvant, ou liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène.  
20 Le pH de la formulation est en outre ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation,  
25 de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidoses, sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible  
30 d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié. Selon un mode particulier de l'invention, cette composition pourra comporter en outre des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prodrogue capable d'être transformée en molécule

5 cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique. Une telle prodrogue sera notamment sélectionnée dans le groupe consistant en l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV), la cyclophosphophamide, la 6-methylpurine deoxyribonucleoside, la 6-thioxanthine, la  
10 cytosine ou un de ses dérivés ou l'uracile ou un de ses dérivés. De plus, lorsque ladite prodrogue est la 5-fluorocytosine (5FC) ou la 5-fluorouracile (5-FU), ledit produit de combinaison peut également comprendre une ou plusieurs substances potentialisant l'effet cytotoxique du  
15 5-FU. On peut citer en particulier, les drogues inhibant les enzymes de la voie de biosynthèse de novo des pyrimidines (par exemple celles citées ci-après), les drogues telles que la Leucovorin (Waxman et al., 1982, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 685-692) qui en présence du  
20 produit du métabolisme du 5-FU (5-FdUMP) augmente l'inhibition de la thymidylate synthase ce qui entraîne une diminution du pool de dTMP nécessaire à la réPLICATION et enfin les drogues telles que le méthotréxate (Cadman et al., 1979, Science 250, 1135-1137) qui en inhibant la  
25 dihydrofolate réductase et en élevant le pool d'incorporation de PRPP (phosphoribosylpyrophosphate) provoque l'augmentation de 5-FU dans l'ARN cellulaire.

De même la composition à administrer peut en outre renfermer une substance sélectionnée dans le groupe comprenant par exemple la chloroquine, les composées protiques comme le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, le 1-méthyl L-2-pyrrolidone et les dérivés de ceux-ci, des composés aprotiques, comme par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO), diéthylsulfoxyde,

5 di-n-propylsulfoxyde, diméthylsulfone, sulfolane, diméthyl-formamide, diméthylacétamide, tetraméthylurée, acétonitrile ou leurs dérivés (voir EP 890 362), les cytokines, particulièrement l'interleukine-10 (IL-10) (WO 9956784), la hyaluronidase (WO 98/53853) et les inhibiteurs des nucléases (WO 9956784) comme par exemple l'actine G. Dans un autre mode de réalisation de l'invention cette substance peut-être un sel et de préférence un sel cationique comme par exemple le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) (EP 998945) et/ou le lithium ( $Li^+$ ). Dans ce cas, la quantité de substance ionique dans le complexe d'acides nucléiques de l'invention varie avantageusement entre 0.1 mM et environ 100 mM, et préférentiellement entre 0.1mM et environ 10 mM.

20 Avantageusement, la composition destinée à être administrée, en fonction de la nature du vecteur utilisé, comprendra :

25 - lorsque le vecteur est d'origine plasmidique, ou vecteur non viral, de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence entre 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée de 0,5 à 5 mg ;

- lorsque le vecteur est d'origine virale, entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement entre  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et de préférence entre  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp.

30 Bien entendu, on pourra apporter à l'invention de nombreuses modifications sans sortir du cadre de celle-ci.

On pourra par exemple utiliser un dispositif selon l'invention comprenant un cathéter unique ou deux cathéters totalement séparés, l'un pour entamer la paroi, l'autre

5 pour administrer la composition, bien que cela soit cliniquement moins avantageux.

On pourra également appliquer l'invention à d'autres conduits que les vaisseaux sanguins, par exemple, l'invention pourra être applicable à l'urologie et la  
10 gastroentérologie.

Enfin, les moyens pour entamer la paroi pourraient ne pas être seulement mécaniques. Ils pourront par exemple, mettre en œuvre des sources laser, des moyens chimiques ou enzymatiques. Plus particulièrement on pourra utiliser des  
15 enzymes capables de digérer la matrice extracellulaire tels que la collagénase ou la hyaluronidase. L'hydrolyse du collagène et de l'acide hyaluronique par ces enzymes engendre une désorganisation de la matrice extracellulaire et facilite l'accès de la composition aux cellule

## REVENDICATIONS

1. Dispositif (2 ; 102) pour administrer une composition dans une paroi d'un conduit (14) d'un corps humain ou animal, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (4 ; 104) aptes à entamer une face interne (12) de la paroi du conduit pour réaliser des ouvertures borgnes (36) dans une épaisseur de la paroi et des moyens de distribution (20 ; 120) pour mettre la composition en contact avec les ouvertures.  
5
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens aptes à entamer (4 ; 104) comprennent des organes de coupe (116) ou de perforation (16).  
10
3. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les moyens pour entamer (4 ; 104) sont extensibles radialement par référence à une direction axiale du dispositif.  
15
4. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les moyens pour entamer (4 ; 104) sont associés à une chambre gonflable (6 ; 106).  
20
5. Dispositif selon les revendications 2 et 4, caractérisé en ce que les organes de coupe ou de perforation (16) sont portés par une paroi de la chambre gonflable (6).  
25
6. Dispositif selon la revendication 2, caractérisé en ce que les moyens pour entamer comprennent des bras (140) portant les organes de coupe ou de perforation (116).  
30

7. Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que les bras (140) sont associés à un tube sur lequel est monté une chambre gonflable(8).

5 8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les moyens de distribution (120) sont extensibles radialement par référence à une direction axiale du dispositif.

10 9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les moyens de distribution (20) présentent des canaux (24) aptes à recevoir la composition, les canaux étant ouverts en direction opposée à un axe du dispositif ou fermés par une paroi contenant des orifices.

15 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les moyens de distribution (20 ; 120) comprennent une paroi présentant des orifices externes (124).

20 11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les moyens de distribution (20 ; 120) sont aptes à entourer les moyens pour entamer (4 ; 104).

25 12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les moyens de distribution (20 ; 120) sont aptes à coulisser par rapport aux moyens pour entamer (4 ; 104) suivant une direction axiale du dispositif.

30 13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le

ballon (4 ; 104) étend radialement les moyens de distribution (20 ; 120).

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est destiné à administrer une composition dans la paroi d'un vaisseau sanguin tel qu'une artère (14), notamment une artère portant un stent (30);

15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cathéter.

17. Dispositif (2 ; 102) pour administrer une composition dans une paroi d'un conduit (14) d'un corps humain ou animal, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens aptes à entamer (4 ; 104) une face interne de la paroi du conduit pour réaliser des ouvertures borgnes (36) dans l'épaisseur de la paroi, ces moyens portant des organes de coupe (116) ou de perforation (16) et étant extensibles radialement par référence à un axe du dispositif, le dispositif comportant des moyens de distribution (20 ; 120) pour mettre la composition en contact avec les ouvertures, les moyens de distribution étant extensibles radialement et aptes à entourer les moyens pour entamer (4 ; 104).

1/6

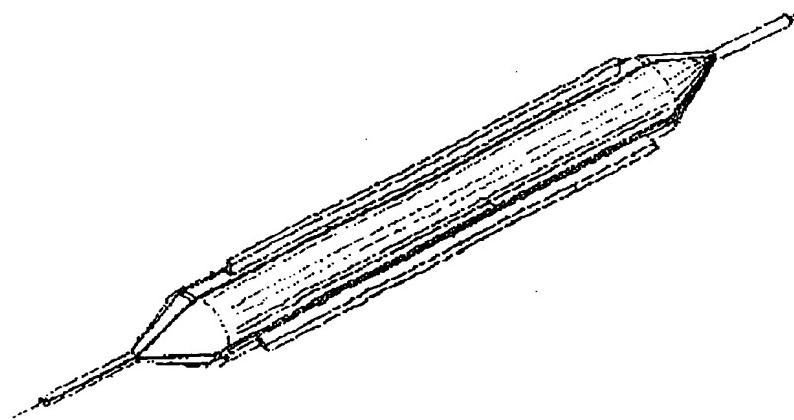


Fig 1

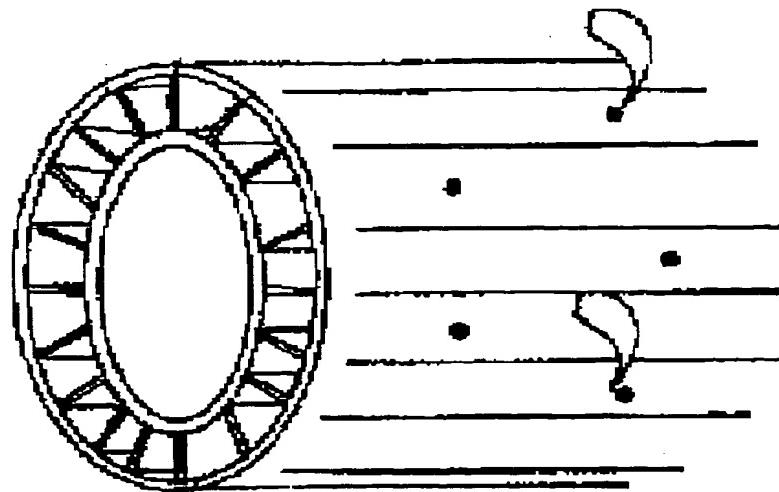


Fig 2

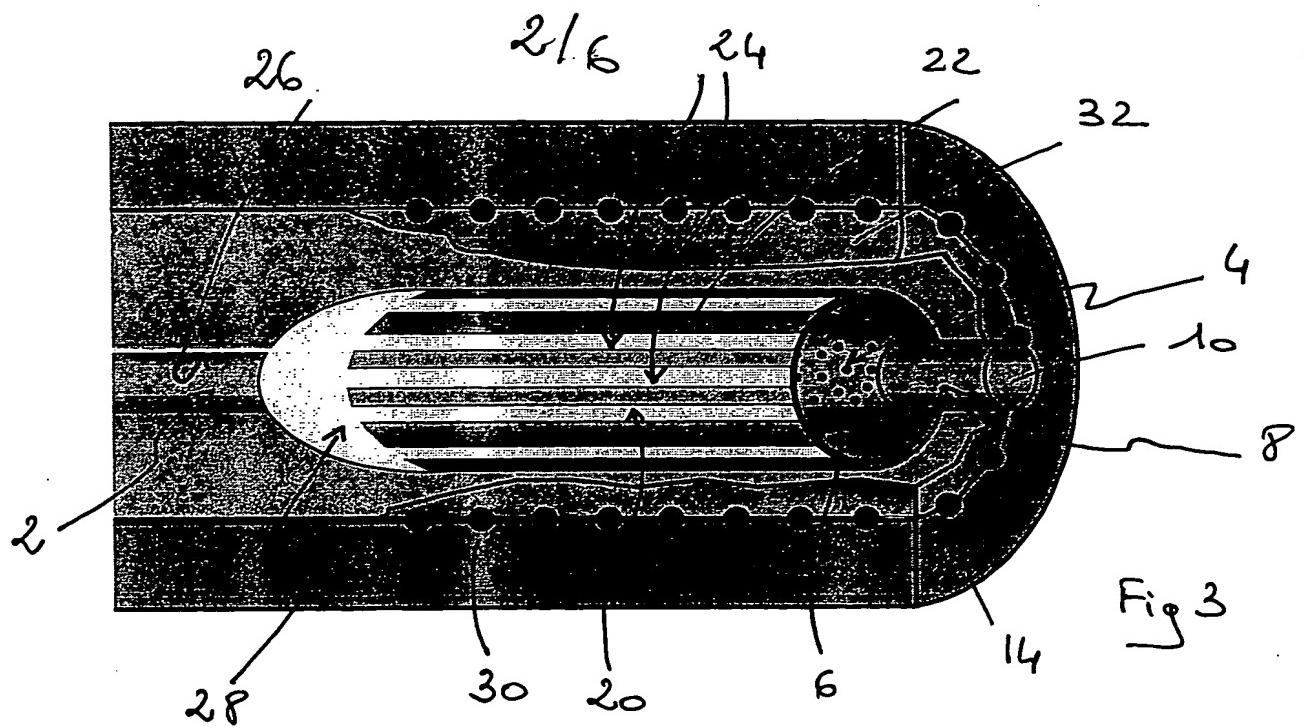


Fig 3

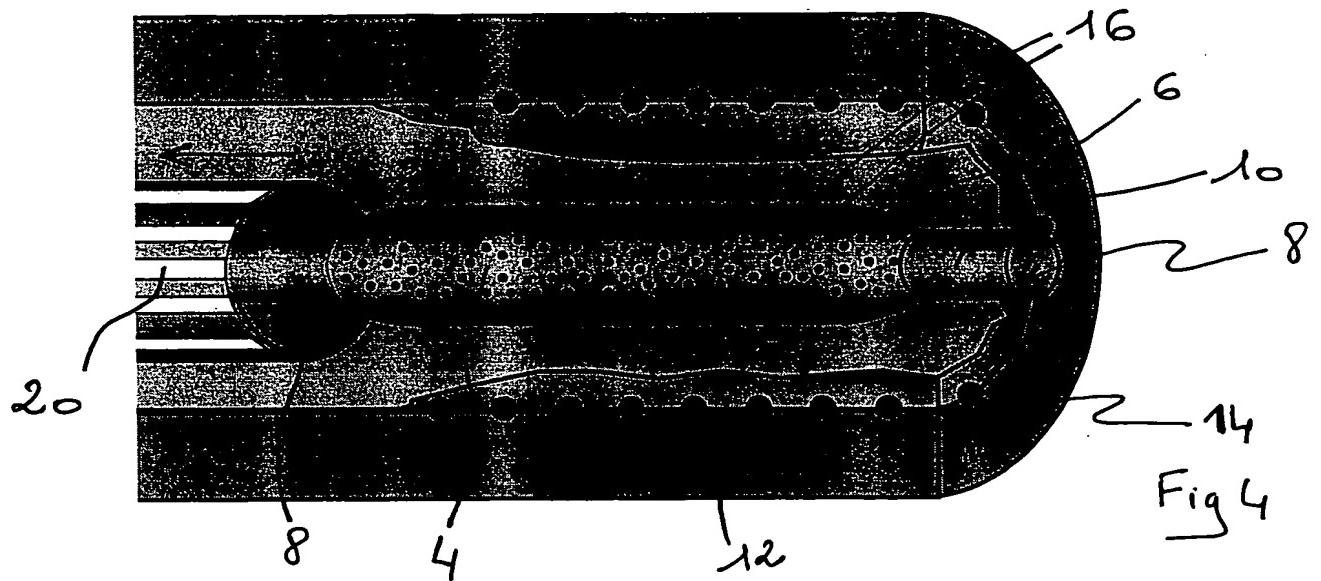


Fig 4

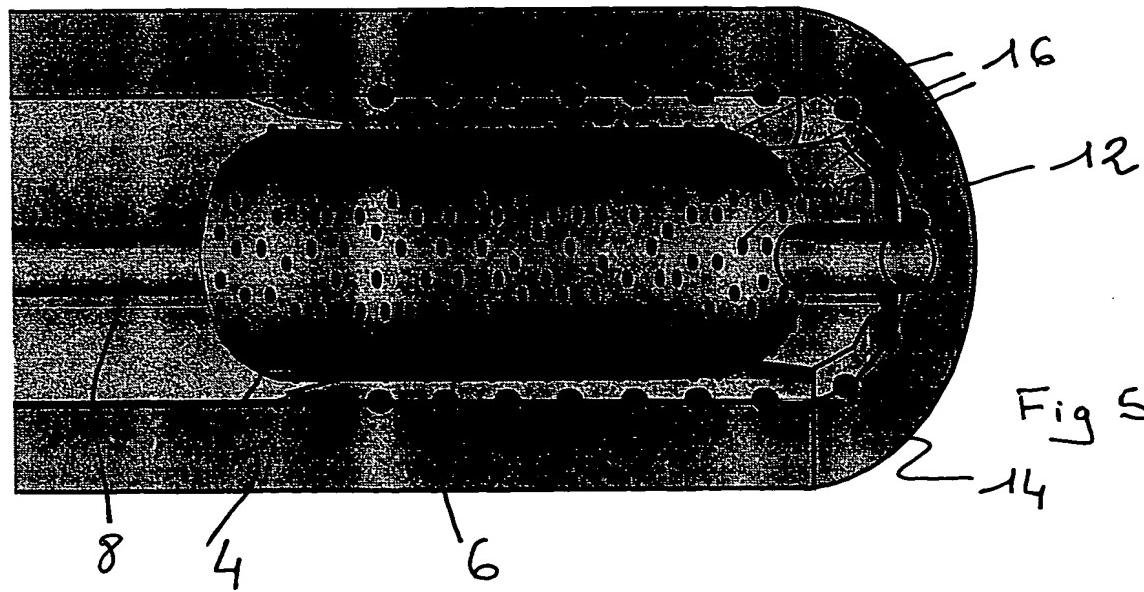
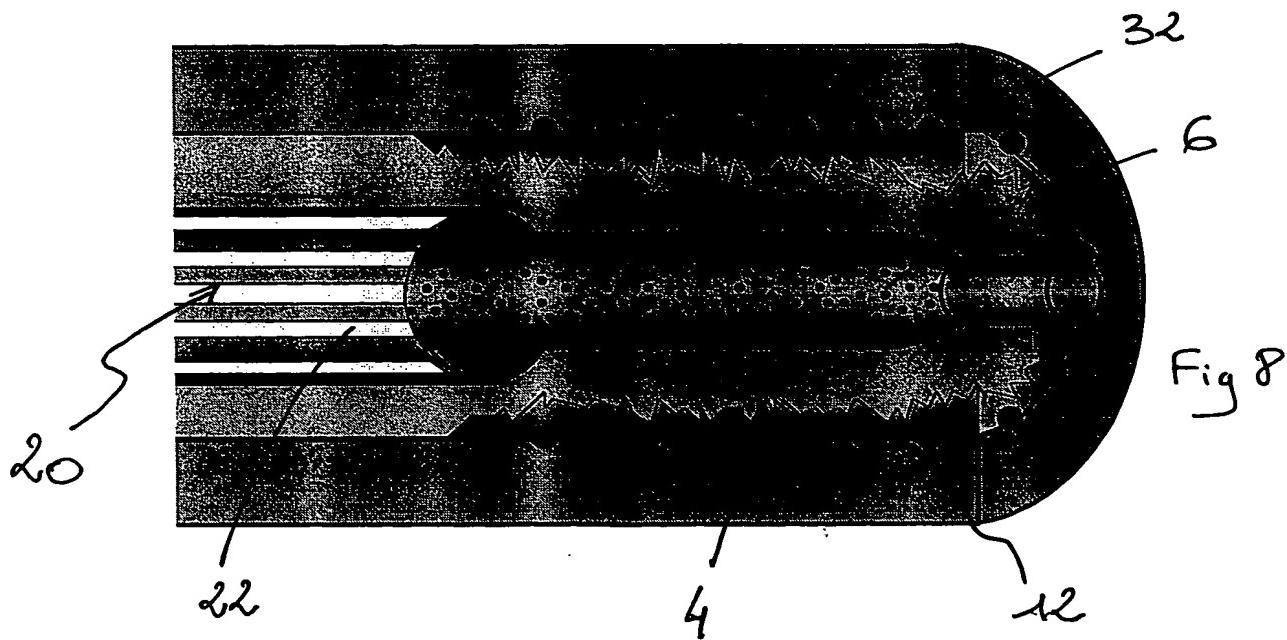
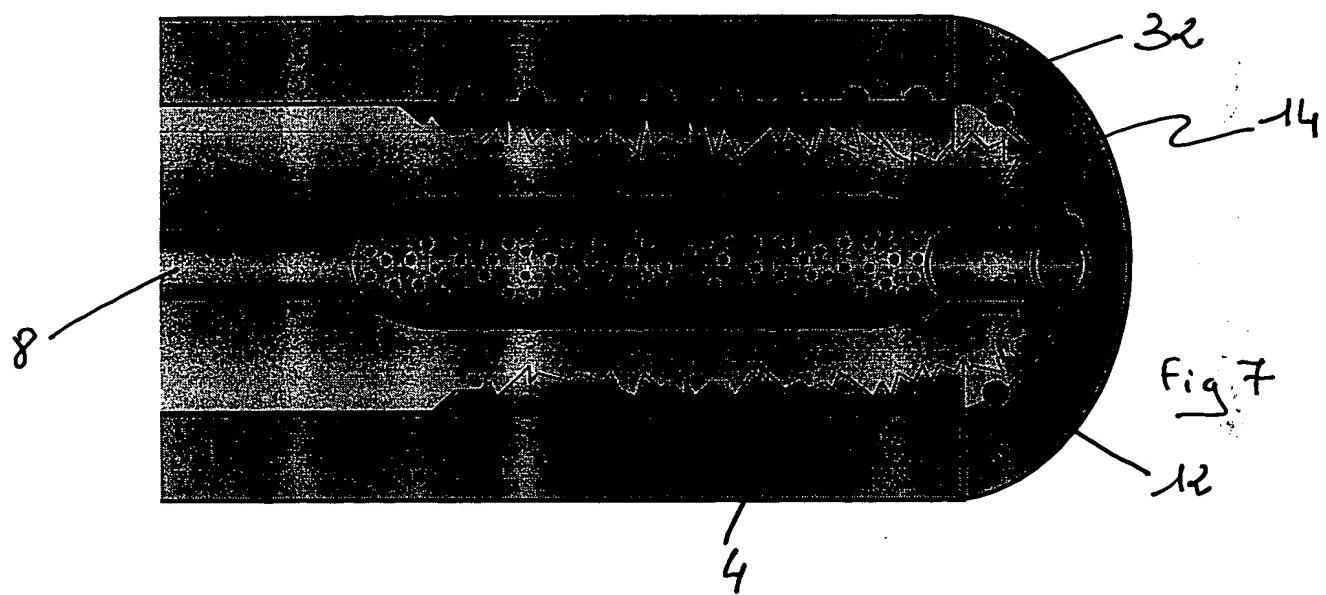
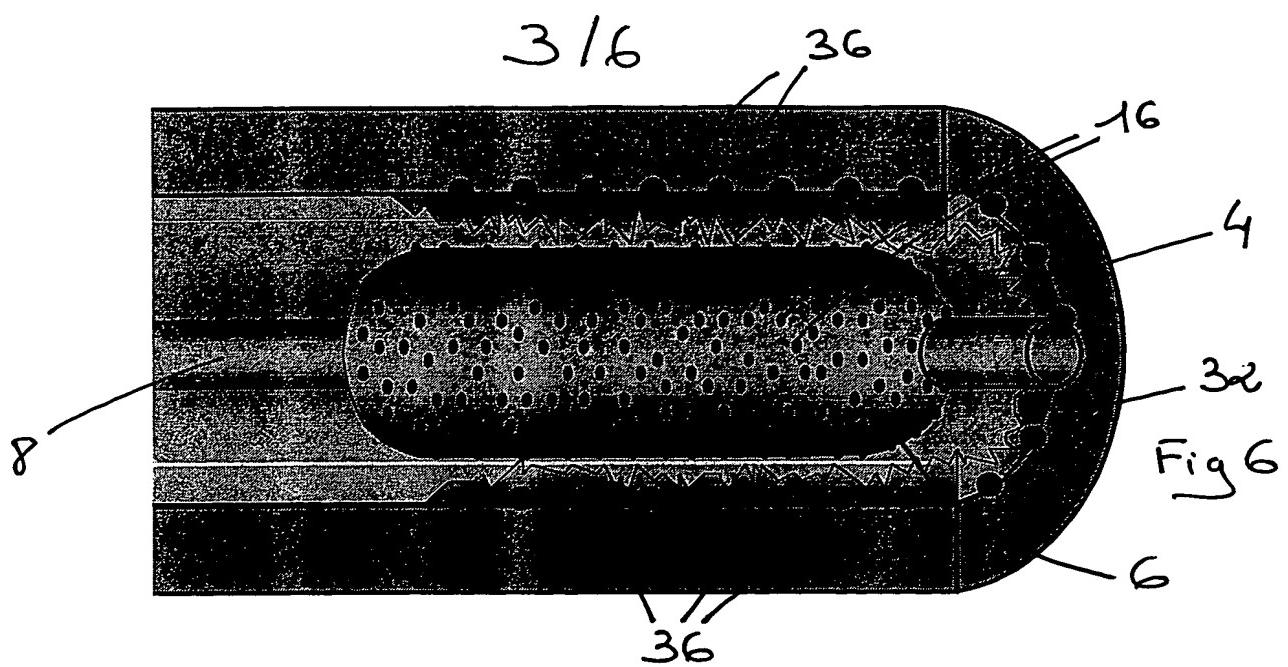


Fig 5



416

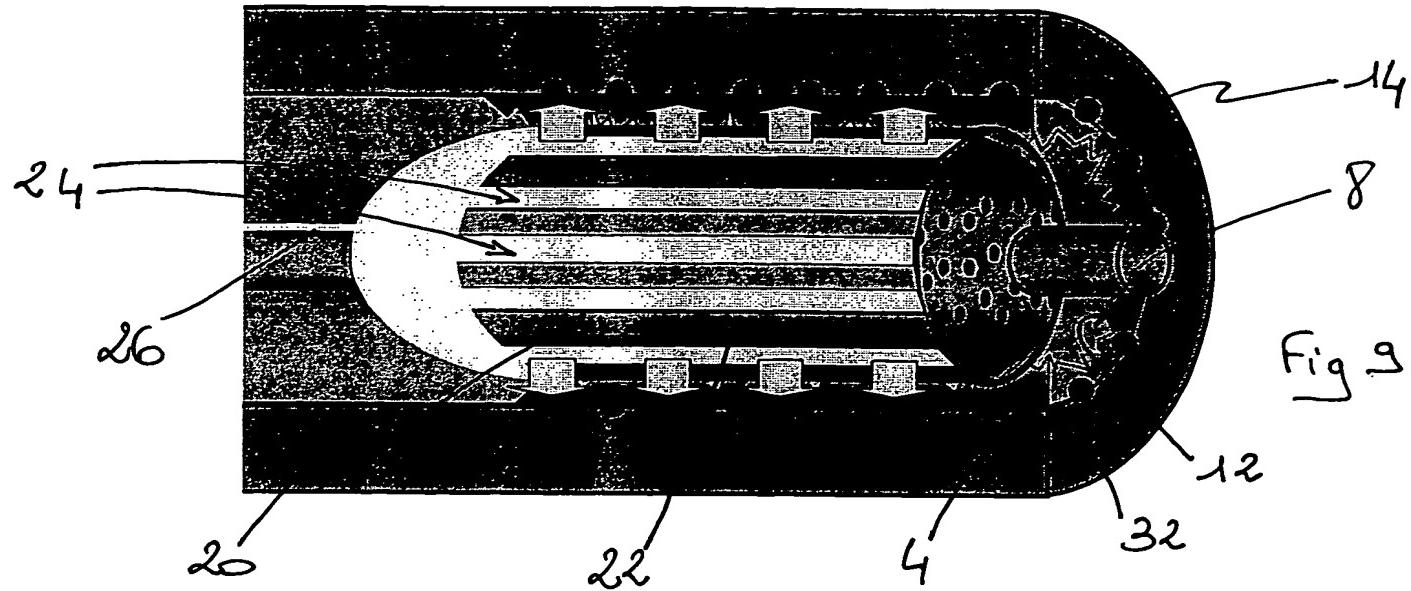


Fig. 9

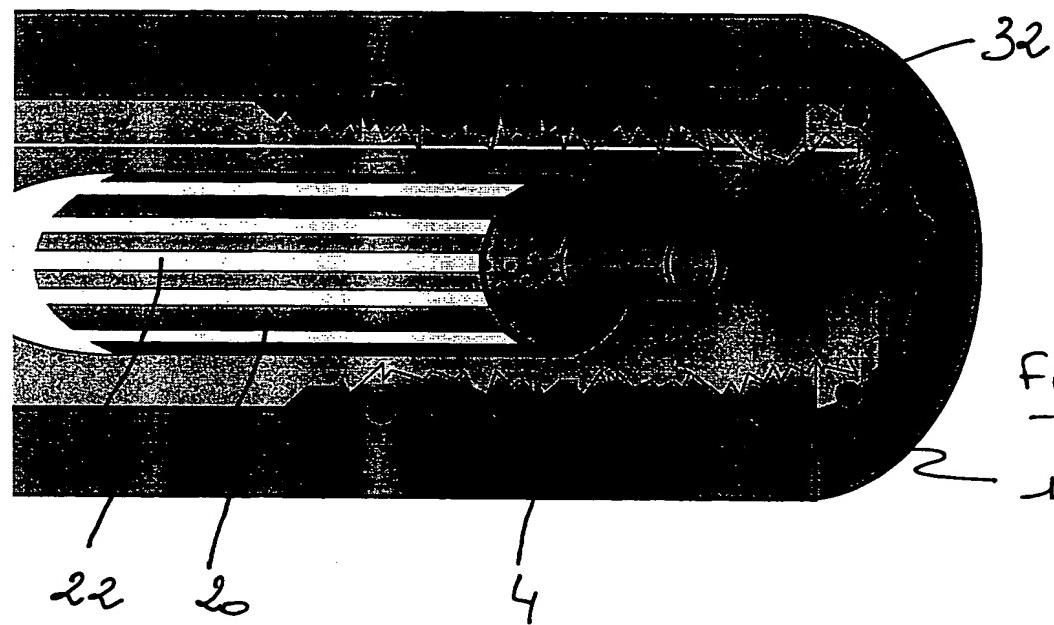
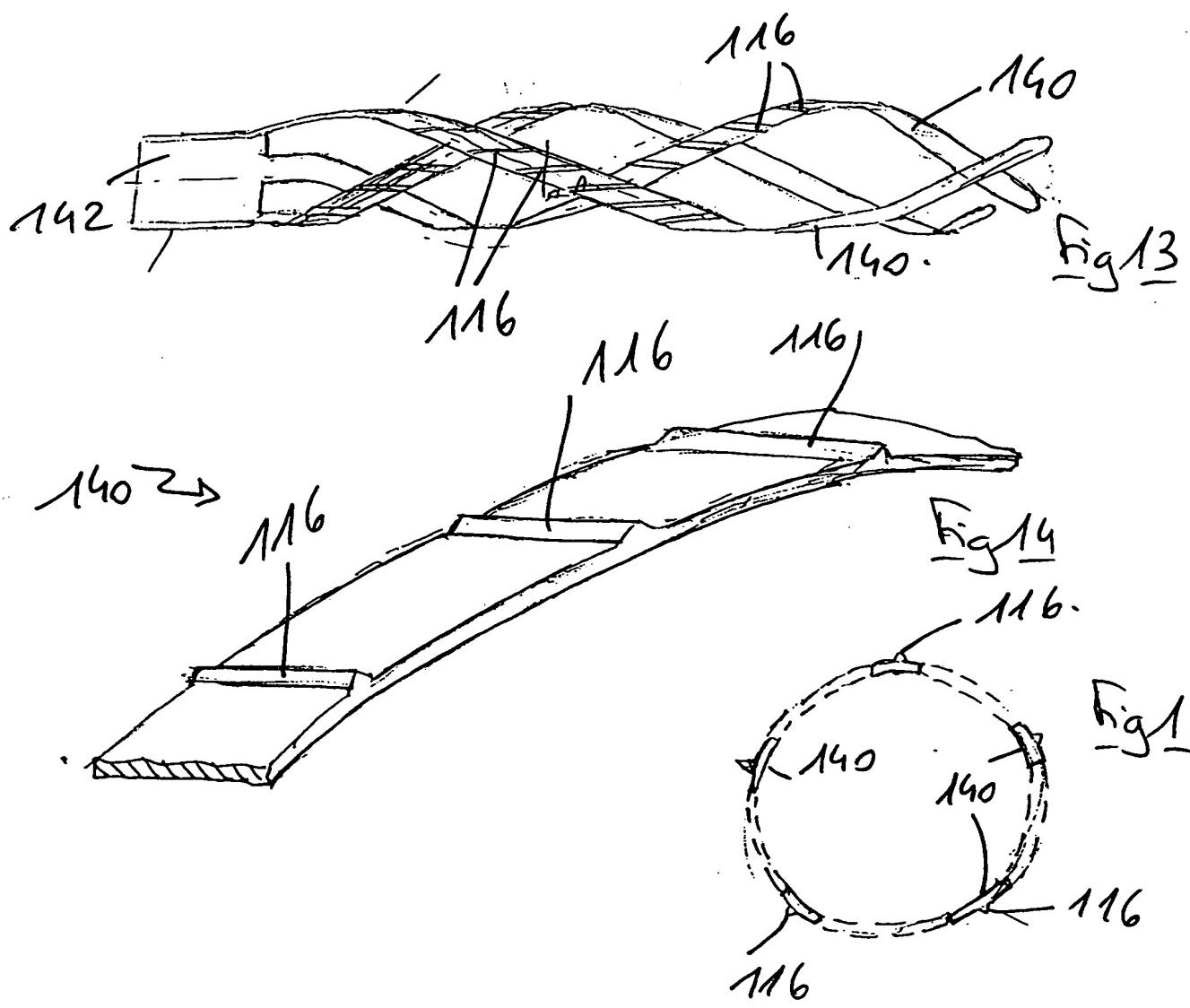
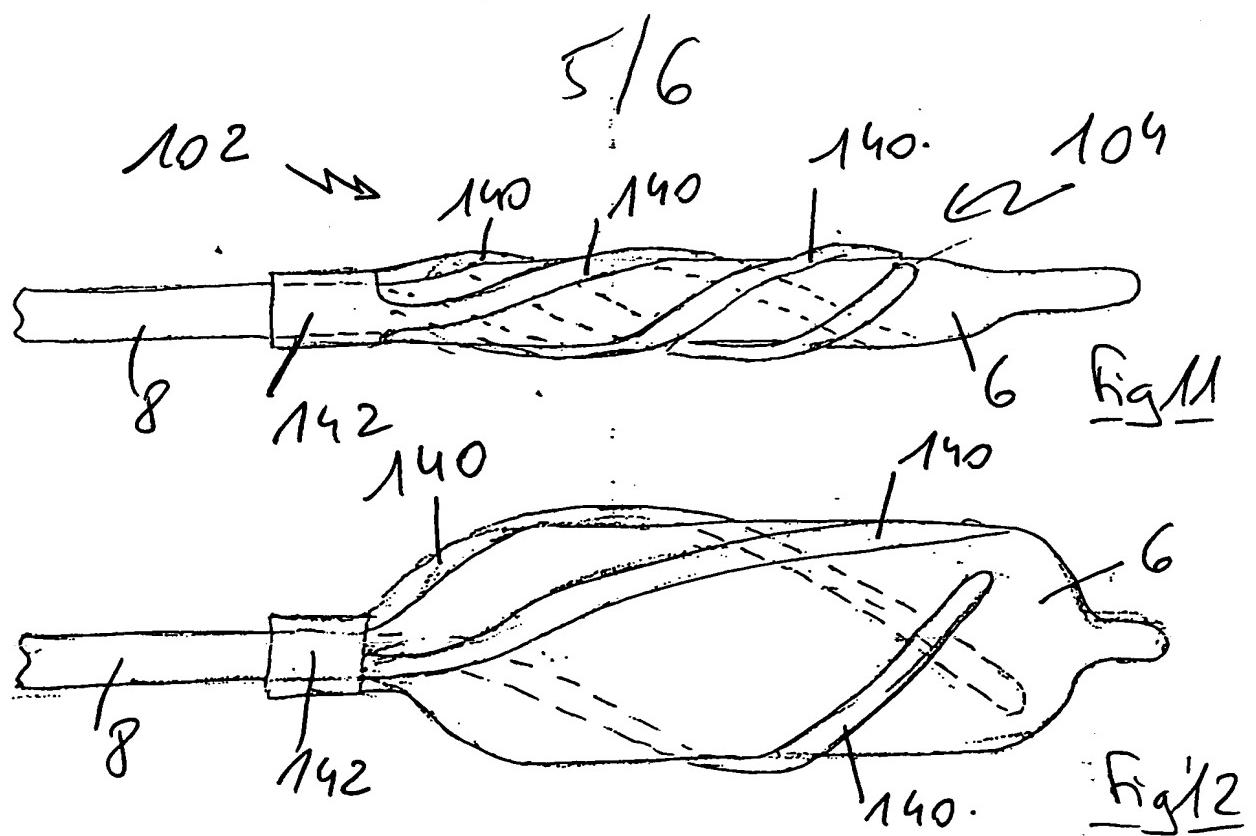


Fig. 10



6/6

